

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 531 714

②1 N° d'enregistrement national : **83 13208**

⑤1 Int Cl³ : C 07 H 19/16.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 11 août 1983.

③0 Priorité JP, 13 août 1982, n° 139,948/82.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 7 du 17 février 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société dite : NIPPON ZEON CO., LTD,*
société de droit japonais. — JP.

⑦2 Inventeur(s) : Shozo Shiozaki, Hideaki Yamada, Yoshiki
Tani et Sakayu Shimizu.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Armengaud Jeune, Casanova et Lepeu-
dry.

⑤4 Procédé de purification de S-adenosyl-L-méthionine.

⑤7 L'invention concerne un procédé de purification de S-ade-
nosyl-L-méthionine.

Ledit procédé consiste à soumettre un liquide contenant la
S-adenosyl-L-méthionine brute à un processus de purification
en série comprenant, dans un ordre désiré quelconque, A. au
moins une étape de traitement dudit liquide avec une résine
d'échange de cations faiblement acide du type H⁺ et B. au
moins une étape de traitement dudit liquide avec une résine
synthétique poreuse adsorbante.

Application à la production de produits à usage pharmaceu-
tique.

FR 2 531 714 - A1

D

La présente invention concerne un procédé de purification de S-adenosyl-L-méthionine (qu'on désignera ci-après de façon abrégée par SAM), et plus particulièrement, un procédé pour isoler efficacement une SAM de grande pureté d'un
5 liquide contenant une SAM brute.

SAM est une substance importante qui participe in vivo au métabolisme des graisses, des protéines et des glucides. Récemment, on a trouvé que SAM avait un effet thérapeutique sur l'adipose jecur, la lipémie, l'artériosclérose,
10 la dépression et l'insomnie, et il est souhaitable de produire SAM en grandes quantités.

De nombreux procédés étaient connus jusqu'à présent pour la purification de SAM. Des exemples particuliers comprennent : (1) un procédé consistant à combiner une étape
15 de traitement d'un liquide contenant SAM avec une résine d'échange de cations fortement acide et une étape de traitement de ce liquide avec du carbone activé (brevet japonais publié sous le N° 13680/1971), (2) un procédé qui consiste à traiter un liquide contenant SAM brut avec une résine
20 d'échange de cations faiblement acide (Enzymologia, Vol. 29, page 283), (3) un procédé consistant à combiner une étape de traitement d'un liquide contenant SAM brut avec une résine d'échange de cations faiblement acide du type H^+ et une étape de traitement de ce liquide avec du carbone activé
25 (demande de brevet japonais mise à l'Inspection Publique N° 14299/1981), (4) un procédé qui consiste à traiter un liquide contenant SAM brut avec une résine du type chélate (brevet japonais publié sous le N° 20998/1978), et (5) un procédé passant par un sel de SAM avec l'acide picrique ou
30 l'acide picrolonique (brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 707 536 et N° 3 954 726).

Le procédé (2) est plus simple du point de vue des étapes de traitement et plus économique que le procédé (1), (4) ou (5), mais il présente comme inconvénient une séparation
35 incomplète de SAM des impuretés et matières étrangères et il ne permet pas d'obtenir SAM avec une pureté suffisam-

ment grande pour une utilisation comme médicament. En ce qui concerne le procédé (3), qui est une amélioration du procédé (1), la pureté de SAM est accrue mais, étant donné que l'adsorption de SAM sur le carbone activé est forte, le pourcentage de récupération en SAM est réduit. Si l'on cherche à accroître le pourcentage de récupération en augmentant la quantité de solvant organique dans un éluant, il en résulte malheureusement une séparation insuffisante de SAM des impuretés et des matières étrangères.

La présente invention se propose donc de fournir un procédé grâce auquel on peut isoler efficacement SAM à un degré de pureté élevé.

La Demanderesse a effectué des recherches intensives pour atteindre cet objectif, et elle a constaté que SAM pouvait être isolé et purifié efficacement à partir d'un liquide contenant SAM brut en combinant une étape de traitement de ce liquide avec une résine d'échange de cations faiblement acide du type H^+ avec une étape de traitement de ce liquide avec une résine synthétique poreuse adsorbante.

Ainsi, selon la présente invention, on dispose d'un procédé pour purifier SAM qui consiste à soumettre un liquide contenant SAM brut à un procédé de purification en série qui comprend, dans un ordre désiré quelconque, (A) au moins une étape de traitement du liquide contenant SAM brut avec une résine d'échange de cations faiblement acide du type H^+ et (B) au moins une étape de traitement de ce liquide avec une résine synthétique poreuse adsorbante.

Il n'y a pas de limitations particulières en ce qui concerne le procédé de production du liquide contenant SAM brut utilisé dans la présente invention. Par exemple, ce liquide est produit par la culture d'un microorganisme appartenant au genre Saccharomyces, Candida ou Mucor capable de produire SAM, dans un milieu de culture contenant de la méthionine pour produire et accumuler SAM à l'intérieur et/ou à l'extérieur des cellules microbiennes, et à extraire

le bouillon de culture avec un agent d'extraction tel que l'acide perchlorique, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique ou l'acide formique ; ou par réaction, par voie enzymatique, d'adénosine-triphosphate et de méthionine en présence de méthionine-adénosyl-transférase.

L'essentiel du procédé de la présente invention consiste à purifier un tel liquide contenant SAM brut en le soumettant à un procédé de purification en série qui comprend, dans un ordre désiré quelconque, (A) au moins une étape de traitement du liquide contenant SAM brut avec une résine d'échange de cations faiblement acide du type H^+ et (B) au moins une étape de traitement de ce liquide avec une résine synthétique poreuse adsorbante.

L'étape de traitement (A) est conduite de la manière suivante.

Tout d'abord, le pH du liquide contenant SAM brut est ajusté en général à 3,5-6,5, de préférence à 4-6,5. Lorsque le pH du liquide contenant SAM brut est trop bas, SAM est difficilement adsorbé sur la résine d'échange d'ions. S'il est trop élevé, SAM est susceptible d'une décomposition. Le procédé d'ajustement du pH n'est pas particulièrement limité. De préférence, l'ajustement du pH s'effectue en utilisant une combinaison d'un acide et d'une substance alcaline capable de former un précipité difficilement soluble ou insoluble dans l'eau, ou une résine d'échange d'anions (du type OH^-).

Par mise en contact du liquide contenant SAM brut, dont le pH a été ajusté de la manière susmentionnée, avec la résine d'échange de cations faiblement acide du type H^+ , SAM de charge positive est sélectivement adsorbé sur la résine d'échange de cations. Les impuretés ayant des charges neutres et négatives dans le liquide ne sont pas adsorbées sur la résine.

La résine d'échange de cations faiblement acide utilisée peut être toute résine d'échange de cations comportant des groupes acide carboxylique comme groupes d'échange

d'ions. Des exemples particuliers en sont Amberlite IRC-50 et IRC-80 (des produits de Rohm & Haas Co.) et Diaion WK20 (un produit de Mitsubishi-Chemical Co., Ltd.). La mise en contact peut s'effectuer par un procédé discontinu ou un
5 procédé à colonne. Ce dernier procédé est préféré en raison de son fonctionnement satisfaisant et de sa facilité d'élimination des impuretés.

SAM adsorbé sur la résine d'échange d'ions est ensuite séparé par élution fractionnée de la résine avec
10 une solution aqueuse d'un acide inorganique ou organique ayant un pH ne dépassant généralement pas 3,0, de préférence compris entre 0,2 et 2,0. L'acide utilisé n'est pas particulièrement limité et l'on peut utiliser, par exemple, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique
15 et l'acide p-toluènesulfonique. Si nécessaire, avant l'élution fractionnée de SAM, on peut laver la résine d'échange d'ions à l'eau ou avec une solution aqueuse diluée d'un acide (par exemple à un pH de 3,5 ou plus) pour éliminer les traces d'impuretés présentes.

20 L'étape de traitement (B) s'effectue de la manière suivante.

Tout d'abord, le liquide contenant SAM brut est ajusté à pH 6,5 ou moins, puis amené au contact de la résine synthétique poreuse adsorbante. L'ajustement du pH et
25 la mise en contact peuvent s'effectuer de la même manière que dans l'étape de traitement (A). La mise en contact avec l'adsorbant a pour résultat une adsorption sélective des amines, de la méthylthioadénosine (le produit de décomposition de SAM) et des matières colorées qui sont les matières
30 étrangères contenues dans le liquide. Par un choix des conditions, comme décrit ci-dessus, SAM et les matières étrangères peuvent être adsorbées ensemble sur l'adsorbant. Dans ce cas, SAM peut être séparé sélectivement par une élution fractionnée de l'adsorbant avec une solution aqueuse d'un
35 acide inorganique ou organique ayant un pH ne dépassant pas 3,5, de préférence compris entre 0,2 et 2,0.

Les acides inorganiques et organiques que l'on peut utiliser peuvent être tous ceux entrant dans la catégorie utilisée dans l'étape de traitement (A). On peut utiliser un solvant organique conjointement à l'acide inorganique ou organique à condition que sa proportion puisse assurer une solution uniforme. Des exemples de solvant organique sont le méthanol, l'éthanol, le n-propanol, l'isopropanol, l'acétone, la méthyl-éthyl-cétone, le formiate de méthyle, l'acétate d'éthyle, le dioxanne et le toluène. Si on le désire, de la même manière que dans l'étape de traitement (A), l'adsorbant peut être lavé à l'eau ou avec une solution aqueuse diluée d'un acide avant l'élution fractionnée afin d'éliminer les traces d'impuretés présentes.

La résine synthétique poreuse adsorbante utilisée dans la présente invention est insoluble dans l'eau et présente une structure de réseau géant. Des exemples particuliers comprennent les adsorbants non polaires à base d'un copolymère styrène/divinylbenzène en tant que matrice tel que Amberlite XAD-2 et XAD-4 (produits de Rohm & Haas Co.) et Diaion HP-10, HP-20, HP-30, HP-40 et HP-50 (produits de Mitsubishi Chemical Co., Ltd.), et des adsorbants moyennement polaires à base d'un polymère d'un ester d'acide acrylique et/ou d'un ester d'acide méthacrylique ou d'un copolymère d'un tel monomère avec un monomère non polaire tel que le styrène et le divinylbenzène comme matrice, par exemple Amberlite XAD-7 et XAD-8 (produits de Rohm & Haas Co.) et Diaion HP-ZMG (produit de Mitsubishi Chemical Co., Ltd.). Si on le désire, ces adsorbants peuvent être utilisés en combinaisons.

Ces adsorbants présentent en commun une adsorption sélective des matières étrangères présentes dans le liquide contenant SAM brut, par exemple des amines et des matières colorées. Ils présentent cependant une adsorbabilité sélective vis-à-vis de SAM selon leur type. En particulier, les adsorbants non polaires adsorbent les matières étrangères mais non SAM, et les adsorbants moyennement

polaires adsorbent SAM ainsi que les matières étrangères dans des conditions d'acidité relativement faible, mais adsorbent uniquement les matières étrangères et non SAM dans des conditions d'acidité relativement forte.

5 Dans le procédé de la présente invention, le traitement de l'étape (A) et le traitement de l'étape (B) sont conduits chacun au moins une fois. La séquence des étapes de traitement est facultative. Des exemples préférés de séquence sont (1) (A) puis (B) ; (2) (B) puis (A) ; (3) (A),
10 (B) puis (A) ; et (4) (B), (A) puis (B). Selon les besoins, l'étape de traitement (A) et/ou l'étape de traitement (B) peuvent être encore enchaînées à ces exemples. A mesure que le nombre des étapes de traitement augmente, les frais entraînés par le procédé de purification sont naturellement
15 légèrement augmentés.

Lorsque l'étape de traitement (B) doit être conduite avant l'étape de traitement (A), il est plus opérationnel de se placer dans des conditions dans lesquelles seules les impuretés sont sélectivement adsorbées sur la
20 résine synthétique adsorbante sans adsorption de SAM. Une technique particulière permettant d'établir de telles conditions consiste par exemple à utiliser un adsorbant non polaire ou un adsorbant modérément polaire et à le mettre en contact dans des conditions acides à un pH ne dépassant
25 pas 3,5, de préférence de 0,2 à 3,0.

Lorsque l'étape finale du procédé de purification en série est l'étape (B), il est possible d'utiliser un procédé consistant à adsorber tout d'abord SAM sur la résine synthétique adsorbante, puis à le séparer, ou un pro-
30 cédé qui consiste à faire passer SAM à travers la résine synthétique adsorbante sans adsorption.

La solution éluée de SAM provenant de l'étape de purification en série décrite ci-dessus est concentrée sous pression réduite, selon les besoins. Ensuite, elle est
35 amenée au contact d'un solvant organique tel que le méthanol, l'éthanol, le n-propanol, l'isopropanol, le n-butanol,

l'isobutanol, le méthoxyéthanol, l'acétone, la méthyl-éthyl-
cétone, le formiate de méthyle, le formiate d'éthyle, l'acé-
tate de méthyle, l'acétate d'éthyle, l'acétate de butyle et
le dioxanne. On peut ainsi obtenir un précipité d'un sel
5 formé entre SAM et un acide inorganique ou organique.
En variante, sans mise en contact de la solution de SAM
avec un solvant organique, on peut obtenir une poudre d'un
sel formé entre SAM et un acide inorganique ou organique en
éliminant l'excès d'acide de la solution de SAM en utili-
10 sant une résine d'échange d'anions (du type OH^-) ou une
substance alcaline capable de former un sel insoluble dans
l'eau par réaction avec l'acide utilisé dans l'élution frac-
tionnée de SAM, puis évaporation du solvant de la solution
sous pression réduite jusqu'à siccité.

15 La résine d'échange d'ions faiblement acide du
type H^+ est régénérée à un stade où SAM en a été élué. Il
n'est donc pas toujours nécessaire de la soumettre à un
traitement de régénération particulier. On peut l'utiliser
de façon répétée après seulement un lavage à l'eau. Par
20 ailleurs, la résine synthétique adsorbante peut être faci-
lement régénérée, par exemple par lavage avec une solution
aqueuse à 50 % de méthanol, puis à l'eau.

Ainsi, selon la présente invention, on peut ob-
tenir efficacement SAM d'un très haut degré de pureté par
25 des opérations simples en utilisant des substances faciles
à régénérer.

Les exemples suivants illustrent la présente in-
vention plus en détail.

EXEMPLE 1

30 On cultive Saccharomyces cerevisiae (IFO 2044)
dans le milieu de culture de F. Schlenk et coll. [Journal
of Biological Chemistry, Vol. 229, page 1037 (1957)] pour
former des cellules microbiennes dans lesquelles est accu-
mulé SAM. On met en suspension 210 g des cellules résul-
35 tantes dans 1000 ml d'acide perchlorique 1,5N et on les
extrait par agitation à la température ambiante pendant

1 heure. Ensuite, on élimine les résidus cellulaires en les séparant par centrifugation. On ajoute de l'hydrogénocarbonate de potassium à l'extrait pour ajuster son pH à 5,0.

On élimine en filtrant par aspiration à la trompe le précipité résultant de perchlorate de potassium pour obtenir
5 1080 ml d'un extrait contenant 1,15 g de SAM.

On fait passer l'extrait à travers une colonne garnie de 200 ml de résine d'échange de cations faiblement acide, Amberlite IRC-50 (type H^+) (marque de fabrique d'un
10 produit de Rohm & Haas Co.) pour adsorber SAM. On lave la colonne avec 400 ml d'acide acétique 0,0001N et la soumet à une élution fractionnée avec de l'acide sulfurique 0,1N pour obtenir 630 ml d'une solution de SAM.

On ajuste le pH de la solution de SAM résultante
15 à 4,5 avec une résine d'échange d'anions faiblement basique, Amberlite IRA-45 (type OH^-) (marque de fabrique d'un produit de Rohm & Haas Co.), puis on la fait passer à travers une colonne garnie de 1,5 litre de Amberlite XAD-7 (marque de fabrique d'une résine synthétique adsorbante du type
20 acrylate fabriquée par Rohm & Haas Co.) pour adsorber SAM. On lave la colonne avec 2 litres d'acide acétique 0,0001N puis on la soumet à une élution fractionnée avec de l'acide sulfurique 0,1N pour obtenir 1440 ml d'une solution de SAM.

On concentre la solution de SAM sous pression
25 réduite jusqu'à ce que son volume total soit de 200 ml. On ajoute ensuite 800 ml d'acétone pour obtenir un précipité de sulfate de SAM. On recueille le précipité par séparation par centrifugation, on le dissout dans une petite quantité d'eau puis on le lyophilise pour obtenir 1,74 g
30 de sulfate de SAM sous forme d'une poudre blanche. Ce produit présente une seule tache dans la chromatographie sur papier et la chromatographie en couche mince sur gel de silice.

Le rendement en SAM et son degré de pureté sont
35 indiqués sur le Tableau 1.

EXEMPLE 2

On fait passer un extrait contenant 1,06 g de SAM, obtenu de la même manière que dans l'Exemple 1, à travers une colonne garnie de 200 ml de Amberlite IRC-84 (type H⁺) (marque de fabrique d'une résine d'échange de cations faiblement acide fabriquée par Rohm & Haas Co.) pour adsorber SAM. On lave la colonne avec 400 ml d'acide chlorhydrique 0,0001N puis on la soumet à une élution fractionnée avec de l'acide chlorhydrique pour obtenir 640 ml d'une solution de SAM.

La solution de SAM est ajustée à pH 4,8 avec Amberlite IRA-45 (type OH⁻), une résine d'échange d'anions faiblement basique, puis on la fait passer à travers une colonne garnie de 1,5 litre de Amberlite XAD-7 (marque de fabrique d'une résine synthétique adsorbante fabriquée par Rohm & Haas Co.) pour adsorber SAM. On lave la colonne avec 2 litres d'acide acétique 0,0001N puis on la soumet à une élution fractionnée en faisant passer un solvant mixte composé d'acide chlorhydrique 0,1N et d'acétone (à un rapport en volume de 1:0,1) pour obtenir 1120 ml d'une solution de SAM.

La solution de SAM est concentrée sous pression réduite jusqu'à ce que son volume total soit de 200 ml, puis on ajoute Amberlite IRA-45 (type OH⁻), une résine d'échange d'anions faiblement basique, pour ajuster le pH de la solution à 2,0. On sépare la résine par filtration par aspiration, et on concentre le filtrat sous pression réduite. On lyophilise le concentré pour obtenir 1,19 g de chlorhydrate de SAM sous forme d'une poudre blanche. Ce produit présente une seule tache dans la chromatographie sur papier et la chromatographie en couche mince sur gel de silice.

Le rendement en SAM et son degré de pureté sont indiqués sur le Tableau 1.

EXEMPLE 3

On fait passer un extrait contenant 0,98 g de SAM, obtenu de la même manière que dans l'Exemple 1, à travers

une colonne garnie de 200 ml de Amberlite XAD-2 (marque de fabriqué d'un adsorbant du type styrène/divinylbenzène fabrique par Rohm & Haas Co.) pour adsorber les matières étrangères. On ajoute de l'hydrogénocarbonate de potassium à la solution de SAM de laquelle les matières étrangères ont été éliminées comme ci-dessus, pour ajuster son pH à 5,0. On sépare le précipité résultant de perchlorate de potassium en filtrant par aspiration.

On fait ensuite passer la solution de SAM à travers une colonne garnie de 200 ml de Amberlite RC-50 (type H^+), une résine d'échange de cations faiblement acide, pour adsorber SAM. On lave la colonne avec 400 ml d'acide acétique 0,0001N et la soumet à une élution fractionnée avec de l'acide sulfurique 0,1N pour obtenir 630 ml d'une solution de SAM.

On concentre la solution de SAM résultante sous pression réduite jusqu'à ce que son volume total soit de 200 ml, puis on ajoute 800 ml d'acétone pour obtenir un précipité de sulfate de SAM. On recueille le précipité en le séparant par centrifugation, on le dissout dans une petite quantité d'eau, et on le lyophilise pour obtenir 1,50 g de sulfate de SAM sous forme d'une poudre blanche. Ce produit présente une seule tache dans la chromatographie sur papier et la chromatographie en couche mince sur gel de silice.

Le rendement en SAM et son degré de pureté sont indiqués sur le Tableau 1.

EXEMPLE 4

On produit des cellules microbiennes contenant SAM accumulé de la même manière que dans l'Exemple 1. On met en suspension 200 g des cellules microbiennes dans 1000 ml d'acide formique 0,1N. On chauffe la suspension à 60°C pendant 10 minutes, puis on la refroidit immédiatement. On sépare les cellules par centrifugation pour obtenir 1020 ml d'un extrait contenant 0,91 g de SAM.

On fait passer l'extrait à travers une colonne

garnie de 200 ml de Amberlite XAD-8 (marque de fabrique d'un acrylate adsorbant fabriqué par Rohm & Haas Co.) pour adsorber les matières étrangères.

La solution de SAM débarrassée des matières étrangères comme ci-dessus est ajustée à pH 5,0 avec Amberlite IRA-45 (type OH^-), une résine d'échange d'anions faiblement basique, puis on la fait passer à travers une colonne garnie de 200 ml de Amberlite IRC-84 (type H^+), une résine d'échange de cations faiblement acide, pour adsorber SAM.

On lave la colonne avec 400 ml d'acide chlorhydrique 0,0001N, puis on la soumet à une élution fractionnée avec de l'acide chlorhydrique 0,2N pour obtenir 710 ml d'une solution de SAM.

On ajoute Amberlite IRA-45 (type OH^-), une résine d'échange d'anions faiblement basique, à la solution de SAM pour ajuster son pH à 2,0. On sépare la résine par filtration par aspiration, et on concentre le filtrat sous pression réduite, et on le lyophilise pour obtenir 1,01 g de chlorhydrate de SAM sous forme d'une poudre blanche. Ce produit présente une seule tache dans la chromatographie sur papier et la chromatographie en couche mince sur gel de silice.

Le rendement en SAM et son degré de pureté sont indiqués sur le Tableau 1.

EXEMPLE 5

On fait passer 630 ml d'une solution de SAM, obtenue par traitement avec l'adsorbant styrène/divinylbenzène et la résine d'échange de cations faiblement acide de type H^+ de la même manière que dans l'Exemple 3, à travers une colonne garnie de 200 ml d'un adsorbant du type acrylate, Amberlite XAD-7, pour adsorber les matières étrangères.

La solution de SAM dont les matières étrangères ont été éliminées comme ci-dessus est concentrée sous pression réduite jusqu'à ce que son volume total soit de 200 ml. On ajoute ensuite 800 ml d'acétone pour former un précipité de sulfate de SAM. On recueille le précipité en le séparant par centrifugation, on le dissout dans une petite quantité

d'eau, et le lyophilise pour obtenir 1,46 g de sulfate de SAM sous forme d'une poudre blanche. Ce produit présente une seule tache dans la chromatographie sur papier et la chromatographie en couche mince sur gel de silice.

5 Le rendement en SAM et son degré de pureté sont indiqués sur le Tableau 1.

Exemple Comparatif 1

On ajuste à 5,0 le pH de 950 g d'un extrait contenant 0,98 g de SAM, obtenu de la même manière que dans
10 l'Exemple 1, avec de l'hydrogénocarbonate de potassium. On sépare le précipité résultant de perchlorate de potassium par filtration par aspiration pour obtenir un liquide contenant SAM.

On fait passer le liquide contenant SAM à travers
15 une colonne garnie de 200 ml de Amberlite IRC-50 (type H⁺), une résine d'échange de cations faiblement acide, pour adsorber SAM. On lave la colonne avec 400 ml d'acide acétique 0,0001N, puis on la soumet à une élution fractionnée avec de l'acide sulfurique 0,1N pour obtenir 610 ml d'une solution de SAM.
20

On fait passer la solution de SAM à travers une colonne garnie de 200 ml de carbone actif chromatographique. On lave la colonne avec 600 ml d'acide sulfurique 0,2N, puis on la soumet à une élution fractionnée avec un solvant
25 mixte se composant d'acide sulfurique 1,0N et de méthanol (1:1 en volume) pour obtenir une solution de SAM.

On concentre la solution de SAM sous pression réduite jusqu'à ce que son volume total soit de 200 ml. On ajoute 800 ml d'acétone pour obtenir un précipité de
30 sulfate de SAM. On recueille le précipité par séparation par centrifugation, on le dissout dans une petite quantité d'eau, et le lyophilise pour obtenir 1,28 g de sulfate de SAM sous forme d'une poudre blanche. Ce produit présente une seule tache dans la chromatographie sur papier et la
35 chromatographie en couche mince sur gel de silice.

Le rendement en SAM et son degré de pureté sont indiqués sur le Tableau 1.

Exemple Comparatif 2

On répète l'Exemple 1 à la différence qu'on n'effectue que le traitement avec Amberlite IRC-50 (type H⁺) comme traitement de purification.

5 Les résultats sont indiqués sur le Tableau 1.

Tableau 1

		Pureté de SAM (%) (*1)	Réaction à la ninhydrine avec des matières autres que SAM (*2)	Quantité de méthylthio- adénosine (%) (*3)	Rendement en SAM (%)
10					
	Ex. 1	98,1	-	0,08	89
15	Ex. 2	98,0	-	0,1	90
	Ex. 3	98,0	-	0,1	90
	Ex. 4	98,1	-	0,08	90
	Ex. 5	98,5	-	inférieure à 0,05	88
	Ex. Comp. 1	97,6	-	0,4	77
20	Ex. Comp. 2	56,7	++	1,8	90

"Ex." signifie Exemple, et "Ex. Comp." signifie Exemple Comparatif.

(*1) : La pureté de SAM est mesurée par chromatographie bidimensionnelle sur papier.

25 (*2) : La réaction à la ninhydrine avec des matières autres que SAM est déterminée de la façon suivante :

Un échantillon est développé par chromatographie bidimensionnelle en couche mince de cellulose, et la présence de taches autres qu'une tache de SAM qui sont détectées par la formation de couleur à la ninhydrine est mesurée et estimée d'après la méthode suivante à trois graduations.

30

- : Néant

+ : Présence légère

++ : Présence considérable

(*3) : La quantité de méthylthioadénosine est
5 mesurée par chromatographie bidimensionnelle sur papier.

Les résultats ci-dessus montrent clairement que grâce au procédé de la présente invention, on peut obtenir SAM de plus grande pureté en un rendement plus élevé que dans les procédés connus.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de purification de S-adénosyl-L-méthionine caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre un liquide contenant la S-adénosyl-L-méthionine brute à un processus
5 de purification, ce processus étant un processus de purification en série comprenant, dans un ordre désiré quelconque, (A) au moins une étape de traitement dudit liquide avec une résine d'échange de cations faiblement acide du type H^+ et (B) au moins une étape de traitement dudit liquide avec une
10 résine synthétique poreuse adsorbante.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape (A) comprend la mise en contact du liquide contenant la S-adénosyl-L-méthionine brute et ayant un pH de 3,5 à 6,5 avec ladite résine d'échange de cations
15 pour adsorber sur la résine la S-adénosyl-L-méthionine, que contient le liquide, puis à soumettre la S-adénosyl-L-méthionine à une élution fractionnée pour la séparer de ladite résine d'échange de cations en utilisant une solution aqueuse d'un acide ayant un pH ne dépassant pas 3,0.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape (B) comprend la mise en contact du liquide contenant la S-adénosyl-L-méthionine brute et ayant un pH ne dépassant pas 6,5, avec ladite résine synthétique adsorbante de manière à adsorber les matières étrangères contenues dans le liquide sur l'adsorbant.
25

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape (B) comprend la mise en contact du liquide contenant la S-adénosyl-L-méthionine brute et ayant un pH ne dépassant pas 6,5 avec ladite résine synthétique adsorbante de manière à faire adsorber à la fois la S-adénosyl-L-méthionine et les matières étrangères du liquide sur l'adsorbant, puis à soumettre à une élution fractionnée la S-adénosyl-L-méthionine pour la séparer de la résine synthétique adsorbante en utilisant une solution aqueuse d'un
30 acide ayant un pH ne dépassant pas 3,5.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé

en ce que le processus de purification comprend l'étape (A) et l'étape (B), dans cet ordre.

5 6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le processus de purification comprend l'étape (A), l'étape (B) et l'étape (A), dans cet ordre.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le processus de purification comprend l'étape (B) et l'étape (A), dans cet ordre.

10 8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le processus de purification comprend l'étape (B), l'étape (A) et l'étape (B), dans cet ordre.

15 9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'étape (B) comprend la mise en contact du liquide contenant la S-adénosyl-L-méthionine brute et ayant un pH ne dépassant pas 6,5 avec la résine synthétique adsorbante de manière à n'adsorber que les matières étrangères du liquide sur l'adsorbant.

20 10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la première étape (B) comprend la mise en contact du liquide contenant la S-adénosyl-L-méthionine brute et ayant un pH ne dépassant pas 6,5 avec la résine synthétique adsorbante de manière à ne faire adsorber sur l'adsorbant que les matières étrangères contenues dans le liquide.